

5 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurden mature, intraerythrocytäre Formen des Malaria-Erregers *Plasmodium falciparum* zur Präparation zweier subzellulärer Strukturen verwandt; der Rhoptrien des Apikal-Komplexes und der parasitophoren Vakuolen-Membran (PVM). Bei beiden handelt es sich um einzigartige Strukturen, die für den Parasiten von essentieller Bedeutung sind.

Bei der Präparation der Rhoptrien stellte sich heraus, dass diese zusammen mit den Micronemen, ebenfalls Organellen des Apikal-Komplexes, isoliert wurden. Die Isolierung der PVM gelang erstmalig durch die Modifikation eines Protokolls zur Isolierung von Merozoiten, die noch von der PVM umgeben waren (*Parasitophorous Vacuolar Membrane-Enclosed Merozoite Structure*, PEMS).

Die Proteine jeder Präparation wurden dazu verwandt, jeweils zwei-dimensionale *Mastergele* herzustellen, Schablonen der jeweiligen Protein-Verteilung. Dazu wurde im Rahmen dieser Arbeit zunächst die Zwei-dimensionale Polyacrylamid-Gelelektrophorese (2-D PAGE) für *Plasmodium falciparum* etabliert. Die Protein-Verteilungsmuster der *Mastergele* wurde mit derjenigen in präparativen Gelen verglichen. Für letztere wurden Proteine zuvor aus einem Zellextrakt auf unterschiedliche Weise fraktioniert. Ausgesuchte Proteine aus den präparativen Gelen wurden mittels *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionisation Time-Of-Flight* Massenspektrometrie (MALDI-TOF MS) identifiziert und entsprechenden Proteinen in den *Mastergelen* zugeordnet. Die Analyse der Präparationen der Rhoptrien/Micronemen und der PVM sowie die nachfolgenden massenspektrometrischen Analysen lieferten folgende Ergebnisse:

- 1) Der Präparation von Rhoptrien und Micronemen konnte eine Reihe von Proteinen zugeordnet werden, die als Proteine der Parasitophoren Vakuole, der Merozoiten-Oberfläche, der Nahrungsvakuole und des Endoplasmatischen Reticulums (ER) bekannt sind. Es wurden Indizien dafür gefunden, dass zusammen mit den Rhoptrien/Micronemen auch Komponenten eines ER- und/oder Vesikel-vermittelten Transports gereinigt

wurden. Hieraus lässt sich schließen, dass ein derartiger Transportweg über den Apikal-Komplex verläuft und die beteiligten Kompartimente mit ihm in Verbindung stehen.

Es wurden sechs bisher hypothetische Proteine der Präparation zugeordnet, wobei für vier ein Signalpeptid vorhergesagt wird, was auf eine extracytosolische Kompartimentierung hindeutet. Eines davon wird erst sehr spät im Entwicklungszyklus des Parasiten synthetisiert, wodurch besonders nahe liegt, dass es an der Invasion oder Evasion von Plasmodien beteiligt ist.

- 2) Für die Präparation der PVM konnten zunächst die als PEMS bezeichneten Strukturen isoliert werden. Hier zeigte sich eine Kontamination mit Erythrocyten-Plasmamembranen. Während der Präparation der PEMS, die in der Gegenwart von E64 stattfindet, einem Inhibitor von Cystein-Proteasen, wurde beobachtet, dass die Evasion nicht die völlige Zerstörung der Wirtszell-Membran zur Folge hat. Dies deutet darauf hin, dass die Evasion nur an einer begrenzten Stelle der Wirtszelle erfolgt.

Die Merozoiten konnten aus den PEMS mechanisch freigesetzt und so die PVM von den Parasiten getrennt werden. Es stellte sich heraus, dass in der Präparation keine abundanten Verunreinigungen durch Proteine der Plasmamembran und des Cytoskeletts von Erythrocyten, vorhanden waren. Diese, in der vorliegenden Arbeit entwickelte Methodik ermöglicht es erstmalig, die PVM zu isolieren und damit ihr Proteinrepertoire umfassend zu analysieren.

Die Bedeutung von Cystein-Proteasen bei der Evasion der Parasiten wurde bereits bei der Präparation der PEMS gezeigt. Es ist allerdings nicht bekannt, welche Proteasen direkt beteiligt sind. Um dieser Frage nachzugehen, wurde der Cystein-Protease-Inhibitor bADS, ein biotinyliertes Derivat der Aziridin-Dicarbonsäure, gegen intraerythrocytäre Plasmodien eingesetzt. Durch die Biotinylierung wurden Zielproteine von bADS, die ihren Ursprung im Parasiten haben, in der Nahrungsvakuole und zusätzlich im Cytosol der Wirtszelle lokalisiert. Es konnte gezeigt werden, dass die Lokalisation der Proteine, vermutlich Cystein-Proteasen, stadienspezifisch ist. In späten Stadien der Parasiten-Entwicklung sind sie hauptsächlich in der Nahrungsvakuole nachzuweisen, bei Trophozoiten-infizierten Erythrocyten jedoch zusätzlich im Wirts-Cytosol. Diese Beobachtungen lassen auf eine wichtige Funktion von Cystein-Proteasen bei der Parasiten-Reifung und seiner Evasion aus der Wirtszelle schließen. Mit Hilfe der 2-D PAGE und anschließender Affinitäts-Markierung von bADS gekoppelten Proteinen konnten zwischen 20 und 30 Proteine als mögliche Zielproteine des Inhibitors sichtbar gemacht werden.

Christoph Gelhaus:

Analyse des subzellulären Proteinrepertoires von intraerythrocytären Stadien des Malariaerregers *Plasmodium falciparum* (WELCH 1897)

Eines davon ist Falcipain 2, eine bereits bekannte Cystein-Protease in *Plasmodium*. Des Weiteren wurden Indizien gefunden, dass ein Prozessierungsprodukt von SERA als aktive Protease an bADS bindet.

Die Erkenntnisse aus der vorliegenden Arbeit liefern die Grundlagen zu einer weiterführenden Analyse derjenigen Proteine, die mit dem Apikal-Komplex und/oder der PVM assoziiert sind. Die Identifizierung und Untersuchung der Cystein-Proteasen in murenen Parasitenstadien werden deren Funktionen im intraerythrocytären Entwicklungszyklus aufklären.

Dies alles wird dazu beitragen, die molekularen Mechanismen der Invasion und der Evasion des Parasiten in seine und aus seiner Wirtszelle zu verstehen.